IN VITRO AKTIVITÄT VON NORFLOXACIN

IM NATIVMEDIUM UND URIN

Maja Ottnad - Walz

1983

Aus dem Zentrum der Inneren Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt
Infektionslaboratorium

In vitro Aktivität von Norfloxacin im Nativmedium und Urin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
des Fachbereiches Humanmedizin
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von Maja Ottnad-Walz
aus München

Frankfurt am Main, 1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan : Prof.Dr.med.H.J.Müller
Referent : Priv.doz.Dr.med.P.Shah
Korreferent: Prof.Dr.med.dent.D.Windecker

Tag der mündlichen Prüfung : 22.06.83

Druck: dipa-Druck, 6000 Frankfurt 1, Tel. 55 61 88

Meinen Eltern in großer
Dankbarkeit gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523705_0034

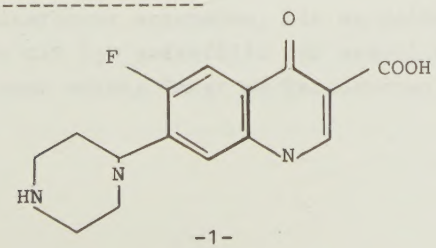
GLIEDERUNG

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
II.	MATERIAL UND METHODE	3
III.	EIGENE ERGEBNISSE	8
	1. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration	
	von a) Escherichia coli	8
	b) Enterobacter cloacae	11
	c) Klebsiellen pneumoniae	13
	d) Pseudomonas aeruginosa	15
	e) Proteus Spezies	18
	f) Citrobacter Serratia marescens	22
	für NORFLOXACIN und Vergleichsmedikamente	
	2. Vergleich der MHK in flüssigem und auf festem Medium	24
	3. Vergleich zweier verschiedener fester Medien	25
	4. Einsaatabhängigkeit	26
	5. Subinhibitorische Aktivität von NORFLOXACIN	27
	6. Wirkung von NORFLOXACIN auf Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase	36
	7. Kinetik der Bakterizidie von NORFLOXACIN	44
IV.	DISKUSSION	50
V.	ZUSAMMENFASSUNG	57
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	58

I. EINLEITUNG

Die Behandlung von Harnwegsinfektionen durch empfindliche Erreger ist relativ unproblematisch.Hierzu stehen eine große Anzahl Antibiotika zur Verfügung.Werden die Infektionen jedoch von multiresistenten Keimen hervorgerufen,dann ist die Behandlung problematisch. Die Therapie ist oft nur parenteral möglich. Bei rezidivierenden Harnwegsinfektionen und zur Rezidivprophylaxe wird die Gabe von Harnwegsdesinfizienzien empfohlen.Diese erreichen hohe Urinkonzentrationen, jedoch keine Gewebskonzentrationen.Als Prototypen solcher Substanzen sind Nitrofurantoin und Nalidixinsäure zu nennen.In den letzten Jahren folgten den oben genannten Chemotherapeutika Pipemidsäure und Cinnoxacin,beide mit erweitertem Wirkungsspektrum.Einer japanischen Forschergruppe gelang die Herstellung eines neuen Derivats der Pyridopyrimidincarbonsäure: NORFLOXACIN.Norfloxacin zeichnet sich durch eine hohe Aktivität gegenüber einem breiten Spektrum von grampositiven und gramnegativen Bakterien aus.Es handelt sich um eine Weiterentwicklung von Nalidixinsäure.Chemische Formel von NORFLOXACIN: 1-Ethyl-6-fluoro1, 4-dihydro-4-oxo-7-(1-piperazinyl)-3-quinoline carboxylic acid.

Chemische Struktur:



Das Chemotherapeutikum zeichnet sich vorallem durch eine höhere Aktivität gegenüber gramnegativen Bakterien im Vergleich zu Nalidixinsäure,Pipemidsäure und Cinnoxacin,sowie einer guten Hemmfähigkeit gegen Pseudomonas aeruginosa aus.Es erschien daher interessant die Aktivität von Norfloxacin gegenüber obengenannten Substanzen zu untersuchen.Da alle Substanzen durch den Tubulusapparat der Niere ausgeschieden werden,lag es nahe,zu den in vitro Versuchen in den üblichen Nährlösungen Urin als Medium hinzu zu nehmen.

II. MATERIAL UND METHODE

1. Keime

Alle für die Untersuchungen benötigten Testkeime stammten aus der Routinediagnostik des Infektionslabors des Zentrums der Inneren Medizin im Zeitraum Dezember 1980 bis Juni 1981. Die Bakterienstämme wurden ursprünglich aus menschlichem Untersuchungsmaterial isoliert, differenziert und während der Untersuchungszeit auf Schrägagar (DST) im Kühlschrank aufbewahrt. Die untersuchten Stämme waren Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Proteus-, Citrobacter- und Serratia-Species, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae.

2. Chemotherapeutika

Alle für die Versuche benötigten Chemotherapeutika lagen als Testsubstanzen mit Aktivitätsangabe vor:

Cinnoxacin	(Lot 80A023 99 %)
Pipemidsäure	(800520/Pi 1.000 mg- 1,17 mg Testsubstanz)
Nalidixinsäure	(RF 3742; Sterling Winthrop)
Norfloxacin	(AM-715, L-643 316-00J03, Merck, Sharp & Dohme weiterer Testname MK-0366)

Bis auf Pipemidsäure, das in sterilem H_2O aufgelöst wurde, wurde den anderen Chemotherapeutika solange Na-Bicarbonat zugegeben, bis es gelöst war, dann wurde mit H_2O aufgefüllt und steril filtriert. Die Lösungen wurden immer am Versuchstag hergestellt.

3. Medien

Als Nährmedien dienten:

a) DST-Agar (Oxoid)
CLED-Agar (für Proteus-Spezies)
Müller-Hinton-Agar (Oxoid)
Müller-Hinton-Bouillon (Oxoid)

b) Mittelstrahlurin, von gesunden Probanden am Versuchstag gesammelt, wurde mit Bacto-Agar (Difco) zu festem Nährmedium angesetzt. Der PH lag zwischen 5,5 und 6.

Der Urin wurde bakteriologisch auf Sterilität überprüft. Für die Untersuchungen zur Bestimmung der Kinetik der Bakterizidie sowie subinhibitorischer Wirkungsbereich wurde der Urin zweimal steril gefiltert (Membranfilter Porengröße 0,45).

4. Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

Mit den Chemotherapeutika Norfloxacin, Cinnoxacin, Nalidixinsäure und Pipemidsäure wurden Verdünnungsreihen jeweils in Konzentrationen von 256 - 0,015 mg/l sowohl in DST-Agar als auch unter Verwendung von Urin-Agar (siehe II.3.b) hergestellt. Als Einsaat diente eine 4 Stunden bei 37^{o} Celsius vorbebrütete Kultur. Das Inokulum wurde photometrisch auf 10^{5} Keime eingestellt. Ein Multipointinokulator diente zur Beimpfung der Agarplatten mit maximal 21 Keimen. Die Platten wurden 24 Stunden bei 37^{o} Celsius bebrütet und dann ausgewertet.

Auswertung:

Die Platten wurden mittels Schablone abgelesen; registriert wurde Wachstum oder kein Wachstum. Als minimale Hemmkonzentration wurde diejenige Konzentration bezeichnet, die als niedrigste das Wachstum des Stammes vollständig hemmte.

5. Vergleich festes und flüssiges Medium

Dazu wurde Müller-Hinton-Agar und Müller-Hinton-Bouillon verwandt. Es wurde eine MHK-Untersuchung nach dem Agardilutionsverfahren auf MH-Agar durchgeführt, wie unter 3.a) beschrieben. Dabei wurde die MHK von 21 Keimen gegenüber Norfloxacin bestimmt. Parallel fand eine MHK in flüssigem Medium, nämlich Müller-Hinton-Bouillon, statt (mit denselben Keimen), wobei bei der Auswertung das Röhrchen mit der niedrigsten Konzentration von Norfloxacin, das noch nicht getrübt war, als MHK bezeichnet wurde. Nach 24 Stunden Bebrütungsdauer wurden beide Ergebnisse abgelesen und ausgewertet.

6. Medienvergleich zweier verschiedener fester Medien

Hierzu wurde eine MHK-Bestimmung auf DST und parallel auf Müller-Hinton-Agar mit dem Multipointinokulator durchgeführt. Die Einsaat betrug in diesem Fall 10^7 Keime. Nach 24 Stunden wurde ausgewertet und die Ergebnisse der beiden MHK verglichen.

7. Einsaatabhängigkeit

Sie wurde im Agardilutionsverfahren bestimmt, indem jeweils MHK mit verschieden hoher Einsaat bestimmt wurden. Die Einsaat betrug 10^9, 10^7, 10^5 Keime. Hierzu wurde DST-Agar genommen.

8. Versuche zur subinhibitorischen und lytischen Aktivität

Die Methode ist in früheren Dissertationen aus dem Infektionslabor ausführlich beschrieben.[5,8]

Als flüssiges Medium diente Müller-Hinton-Bouillon (zweimal autoklaviert nach Vorschrift und über Nacht bebrütet und zweimal steril gefilterter Urin). Ein Erlenmeyerkölbchen wurde mit 54,45 ml MHB bzw. Urin gefüllt und mit 0,55 ml Keimen (Inokulumgröße von 10^5 eingestellt im Eppendorf, wie beim MHK-Versuch) beimpft. Dann wurde in optisch einwandfreien Reagenzgläsern eine Verdünnungsreihe mit subinhibitorischen Konzentrationen von Norfloxacin angelegt. Jedes Reagenzglas erhielt 5 ml Nährmedium plus Keim plus Norfloxacin.

Die Messungen erfolgten im Eppendorf-Photometer Hg 546 nm mit Ablesung auf der von 100 bis 1 unterteilten Transmissionsskala. Ein unbeimpftes Glas MHB bzw. Urin diente als Standard, ein weiteres ohne Norfloxacin als Kontrolle für das Wachstumsverhalten des Keimes.

Nun wurden die Röhrchen bei 37^{o} C bebrütet. Stündliche Messungen erfolgten nach 10 Sekunden schütteln auf dem Whirlmixer, um Sedimentationseffekte beim Trübungsmeßverfahren auszuschließen. Die Messungen erfolgten stündlich von 1 bis 8 und nach 24 Stunden.

Bei den Versuchen zur lytischen Aktivität war der Versuchsaufbau entsprechend, jedoch wurde das Chemotherapeutikum erst in der logarithmischen Wachstumsphase bei einer Transmission 70-65 hinzugefügt. Die Chemotherapeutikakonzentration lag so hoch, daß es zum Ausfall von Salzen im Urin kam und dieser für das Photometermeßverfahren unbrauchbar wurde, so daß der Versuch nur in MHB stattfand. Einige der Keimaufschwemmungen wurden zusätzlich nach Abschluß des Versuches ausgestrichen, um zu sehen, welche Keime bei welcher Konzentration noch lebensfähig wären.

9. Kinetik der Bakterizidie

Bei den Bakterizidie-Untersuchungen wurde die Membranfiltermethode durchgeführt; auch hierfür sind die grundlegenden Einzelheiten in den Arbeiten von Klein, Vömel, Overzill und Shah beschrieben. Als Vorkultur dienten wieder 4 Stunden bei 37° C bebrütete Bakterien in Standard I-Bouillon, die anschließend im Photometer auf eine Transmission von 90 eingestellt wurden. 0,5 ml dieser Aufschwemmung wurde 49,5 ml MHB bzw. Urin zugefügt und bei 37° C Norfloxacin ausgesetzt. Zur Zählung der Bakterienkulturen wurde zur Stunde 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 je 0,2 ml entnommen, in 1,8 ml NaCl-Lösung gegeben und eine Verdünnungsreihe hergestellt. Die Verdünnungsstufen wurden dann durch bakteriendichte Membranfilter (Sartorius, Porengröße 0,2 mm, Durchmesser 50 mm) filtriert. Anschließend wurde mit steriler Kochsalzlösung nachgespült.

Die Membranfilter wurden 24 Stunden auf DST-Agar bei 37° C bebrütet. Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde die Einsaat als 100 % genommen und die Zahl der überlebenden Keime hierzu in % ausgerechnet.

Zur Auswertung wurden die gewachsenen Kolonien bestimmt. Jede Kolonie entsprach einem Keim. Nach entsprechender Berechnung erfolgte die graphische Darstellung der zum jeweiligen Zeitpunkt überlebenden Keime in % der Einsaat und die Bestimmung der 99 %igen Abtötungszeit aus der Kurve.

III. EIGENE ERGEBNISSE

1. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration

a) Escherichia coli

Die minimalen Hemmkonzentrationen gegenüber 97 Escherichia coli wurden im Agar-Dilutionsverfahren bestimmt und die Ergebnisse mit denen der folgenden Chemotherapeutika verglichen:

Cinnoxacin, Nalidixinsäure, Pipemidsäure

Die Untersuchungen fanden auf zwei Medien statt:

DST-Agar und Urin Agar

Tabelle 1 enthält die Ergebnisse der Bestimmungen. Auf der Abbildung 1 ist die graphische Darstellung der Häufigkeitsverteilung der minimalen Hemmkonzentrationen.

Aus Tabelle und Abbildung läßt sich auf DST-Agar eine weitaus günstigere Wirkungen von Norfloxacin gegenüber den Vergleichschemotherapeutika ablesen. So sind bei 0,25 mg/l 90 % der Stämme gehemmt, während man dazu 4 mg/l von Cinnoxacin und Pipemidsäure, sowie 8 mg/l von Nalidixinsäure benötigt, also 16 bzw. 32 mal soviel.

Deutlich ist der Wirkungsverlust aller Chemotherapeutika auf Urin-Agar. Während jedoch zu einer 90 %igen Hemmung das Zweifache (16 mg/l Nalidixins.) bzw. das 8-fache (32 mg/l Cinnoxacin) bzw. das 16-fache (64 mg/l Pipemids.) der Konzentrationen auf DST-Agar benötigt wird, erzielt erst eine 64-fache Dosis von Norfloxacin dieselbe Wirkung (16 mg/l).

TELLE 1

Minimale Hemmkonzentrationen von
Cinnoxacin, Nalidixinsäure, Pipemidsäure und MK
gegenüber ESCHERICHIA COLI (n=97)

(DST-, Urin-Agar-Plattentest)

mg/l

bstanz	Medium	0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
noxacin	Urin								1	20	13	39	21	1	1		1
	DST							13	53	23	2	1			2	1	2
idixin-re	Urin								3	30	39	20		2			3
	DST							19	48	15	8	2		1	2	1	1
emid-re	Urin										10	44	25	13	2	1	2
	DST						5	41	41	3	1	3	1		1		1
- 0366	Urin							1	45	17	12	17	5				
	DST	2	29	34	17	11	2	1	1								

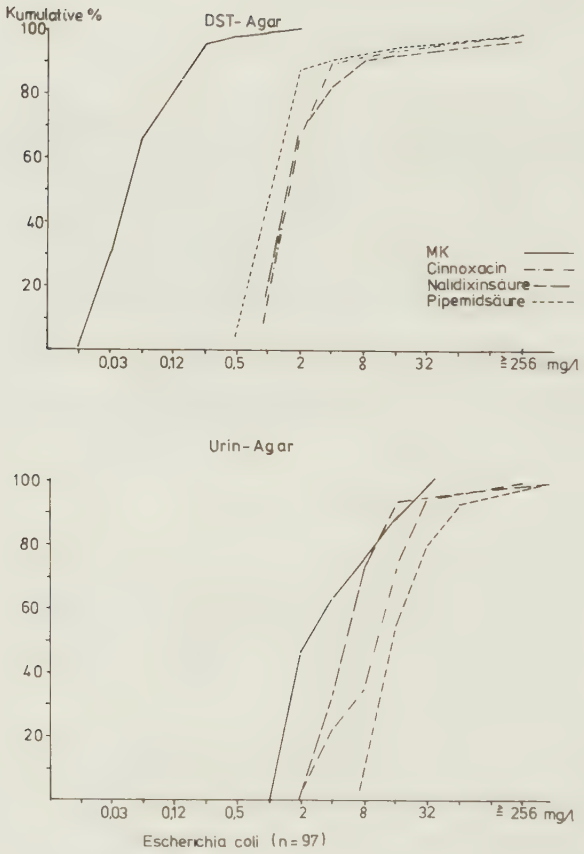


Abbildung 1

Minimale Hemmkonzentrationen von Norfloxacin,Cinnoxacin,Pipemidsäure und Nalidixinsäure gegenüber E. coli (n=97; DST-,Urin-Agar)

b) Enterobacter cloacae

Bei 68 Enterobacter cloacae-Stämmen wurde die minimale Hemmkonzentration bestimmt (Tabelle 2, Abbildung 2).

Wie gegenüber Escherichia coli zeigte Norfloxacin auch gegenüber Enterobacter cloacae in DST-Agar eine starke Aktivität, die jedoch in Urin-Agar deutlich schwächer ist. (Zu einer 90 %igen Hemmung werden 8 mg/l Cinnoxacin, 2 mg/l Pipemidsäure, 4 mg/l Naldixinsäure, 0,25 mg/l Norfloxacin benötigt.)

Auch bei den anderen untersuchten Substanzen ist ein Wirkungsverlust im Medium Urin auffällig. Cinnoxacin benötigt auf Urin-Agar für eine 90 %ige Hemmung 32 mg/l Nalidixinsäure, 16 mg/l Pipemidsäure ebenfalls 16 mg/l und Norfloxacin 4 mg/l.

TABELLE 2

Minimale Hemmkonzentrationen von Cinnoxacin, Nalidixinsäure, Pipemidsäure und MK gegenüber ENTEROBACTER CLOACAE (n=68)

(DST-, Urin-Agar-Plattentest)

mg/l

Substanz	Medium	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
Cinnoxacin	Urin							2	5	20	29	8	4
	DST							8	36	17	5	1	1
Nalidixin-säure	Urin								3	19	41	5	
	DST						2	29	31	4	1	1	
Pipemid-säure	Urin								1	13	27	23	4
	DST					1	18	40	5	4			
MK - 0366	Urin			1	2	9	14	11	22	5	4		
	DST	13	28	12	12	2	1						

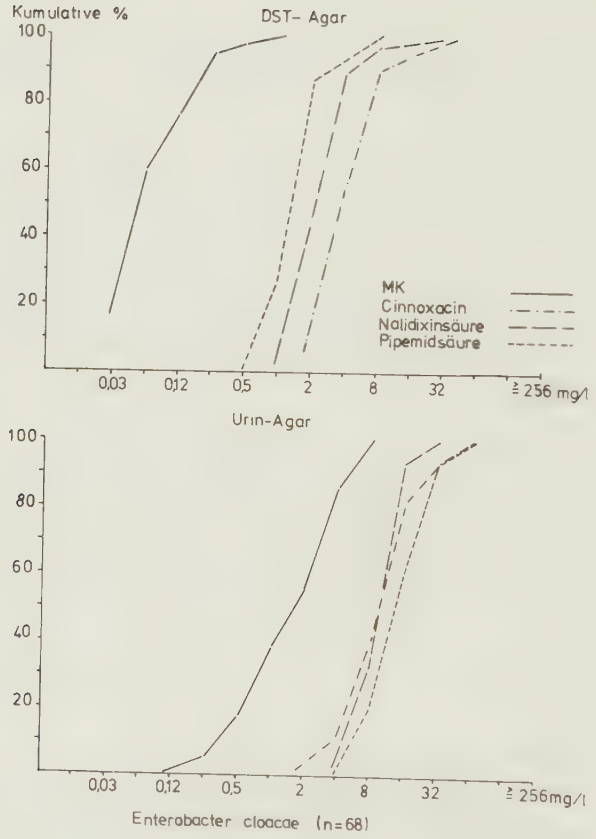


Abbildung 2

Minimale Hemmkonzentrationen von Norfloxacin,Cinnoxacin,Pipemidsäure und Nalidixinsäure gegenüber E. cloacae (n=68; DST-,Urin-Agar).

c) Klebsiella pneumoniae

Die Ergebnisse der MHK-Bestimmungen gegenüber 87 Klebsiella pneumoniae sind auf der Tabelle 3 bzw. Abbildung 3 dargestellt.

Wie aus der Abbildung und Tabelle hervorgeht, ist im DST-Agar Norfloxacin gut wirksam. Norfloxacin hemmt 90 % der Stämme bei 0,25 mg/l. Dazu benötigt man 4 mg/l von Pipemidsäure und jeweils 8 mg/l von Cinnoxacin oder Nalidixinsäure.

Beim Versuch auf Urin Agar ergibt sich wieder ein deutlicher Wirkungsverlust aller Chemotherapeutika. So hemmt Norfloxacin über 90 % der Stämme bei 16 mg/l, wozu Nalidixinsäure und Cinnoxacin 32 mg/l und Pipemidsäure 128 mg/l benötigen.

TABELLE 3

Minimale Hemmkonzentrationen von
Cinnoxacin, Nalidixinsäure, Pipemidsäure und MK
gegenüber KLEBSIELLA PNEUMONIAE (n=87)
(DST-, Urin-Agar-Plattentest)

		mg/l													
Substanz	Medium	0,3	0,6	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
Cinnoxacin	Urin								1	24	40	19	2		1
	DST							3	43	35	1	1	3	1	
Nalidixin-säure	Urin								6	35	28	15		3	
	DST							25	47	8	1	3	2	1	
Pipemid-säure	Urin								1	9	25	25	10	16	1
	DST						15	41	24	3	3	1			
MK - o366	Urin					1	11	15							
	DST	5	21	33	22	2	3	1	15	33	10	1	1		

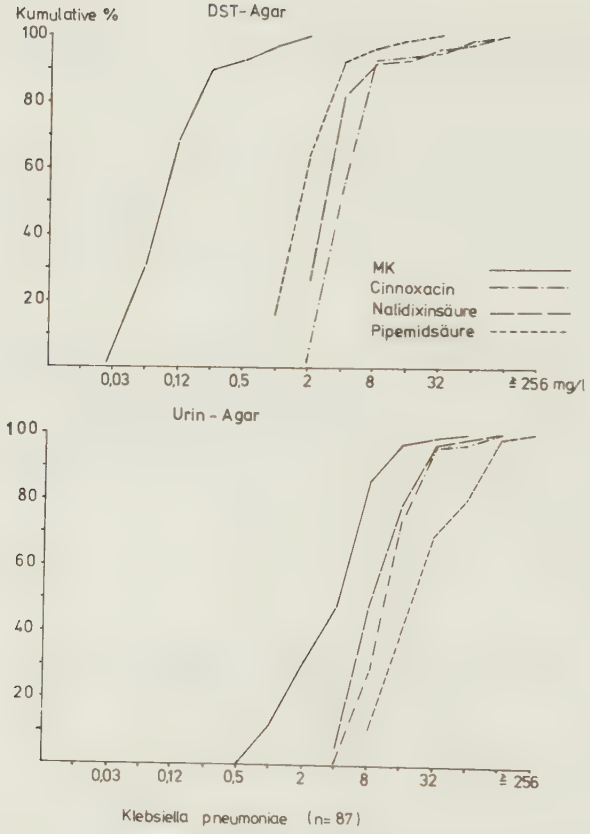


Abbildung 3

Minimale Hemmkonzentrationen von Norfloxacin,Cinnoxacin,Pipemidsäure und Nalidixinsäure gegenüber Klebsiella pneumoniae (n=87; DST-,Urin-Agar).

d) Pseudomonas aeruginosa

Die minimale Hemmkonzentration wurde bei 50 Stämmen der Gattung Pseudomonas aeruginosa bestimmt.

Die Ergebnisse der Bestimmungen enthält Tabelle 4. Die graphische Darstellung der Häufigkeitsverteilung finden Sie in Abbildung 4.

Bei Betrachtung von Abbildung und Tabelle fällt die vergleichsweise gute Wirkung von Norfloxacin auf. Zu einer 50 %igen Hemmung werden 0,5 mg/l Norfloxacin, 16 mg/l Pipemidsäure, 256 mg/l Nalidixinsäure benötigt, während Cinnoxacin mit 256 mg/l eine Hemmung von 30 % erzielt.

Im Gegensatz dazu gelingt eine Hemmung auf Urin-Agar erst bei wesentlich höheren Konzentrationen.

128 mg/l Pipemidsäure und Nalidixinsäure werden benötigt, um eine 50 %ige Hemmung zu erreichen, während Cinnoxacin mit 256 mg/l nur eine 30 %ige Hemmung vermag. Eine 90 %ige Hemmung erzielten Norfloxacin (4 mg/l) und Pipemidsäure (128 mg/l) auf DST-Agar; auf Urin-Agar erzielte Norfloxacin (64 mg/l) eine 90 %ige Hemmung.

TABELLE 4

Minimale Hemmkonzentrationen von
Cinnoxacin, Nalidixinsäure, Pipemidsäure und MK
gegenüber PSEUDOMONAS AERUGINOSA (n=50)
(DST-, Urin-Agar-Plattentest)

mg/l

Substanz	Medium	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
Cinnoxacin	Urin									2	4	1	10	33
	DST									2	4	3	10	31
Nalidixin-säure	Urin									12	9	1	7	21
	DST									4	16	3	7	20
Pipemid-säure	Urin									2	7	15	13	13
	DST						6	16	12	2	5	5	4	
MK - 0366	Urin							2	15	9	21	3		
	DST	7	12	6	10	7	5	1	1		1			

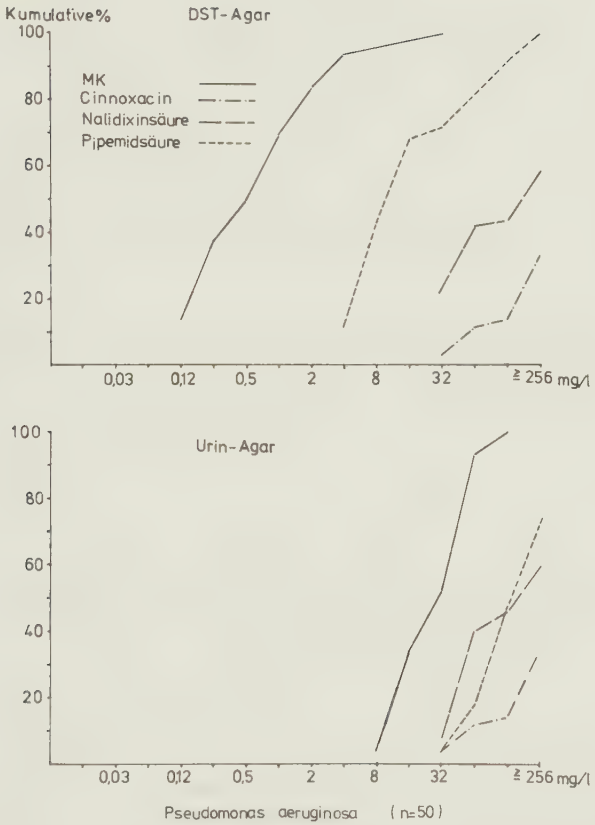


Abbildung 4

Minimale Hemmkonzentrationen von Norfloxacin,Cinnoxacin,Pipemidsäure und Nalidixinsäure gegenüber Pseudomonas aeruginosa (n=50; DST-,Urin-Agar).

e) Proteus Spezies

Bei 79 Stämmen der Gattung Proteus wurde die minimale Hemmkonzentration bestimmt. Es handelte sich um 61 Proteus mirabilis-Stämme und 17 Indol positive Proteus Spezies (2 Stämme Proteus morganii, 3 Stämme Proteus rettgeri, 12 Stämme Proteus vulgaris).

Hier wurde statt DST-Agar CLED-Agar verwandt. Die Ergebnisse der Bestimmungen sind auf Tabelle 5 und Abbildung 5 ersichtlich.

Die Wirkung von MK ist sowohl gegenüber den Indol positiven wie negativen Stämmen als gut bzw. sehr gut zu bezeichnen.

Auf CLED-Agar werden 90 % der Indol negativen Stämme von 0,5 mg/l Norfloxacin , 32 mg/l Cinnoxacin, 16 mg/l Nalidicinsäure, 4 mg/l Pipemidsäure gehemmt. 90 % der Indol positiven Stämme werden von 4 mg/l Cinnoxacin, Nalidixinsäure, Pipemidsäure und 0,12 mg/l Norfloxacin auf CLED-Agar gehemmt.

Auf Urin-Agar erkennt man eine deutliche Verschlechterung der Wirkung aller Substanzen. Eine 90 %ige Hemmung der Indol negativen Stämme wird erreicht von 8 mg/l Cinnoxacin, 64 mg/l Nalidicinsäure, 256 mg/l Pipemidsäure und 16 mg/l Norfloxacin.

Für die Indol positiven Stämme benötigt man hier 4 mg/l Cinnoxacin, 32 mg/l Nalidixinsäure, 64 mg/l Pipemidsäure und 8 mg/l Norfloxacin.

TABELLE 5 a

Minimale Hemmkonzentrationen von Cinnoxacin, Nalidixinsäure, Pipemidsäure und MK gegenüber PROTEUS MIRABILIS (n= 61)

(CLED-, Urin-Agar-Plattentest)

mg/l

Substanz	Medium	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
Cinnoxacin	Urin							5	16	21	10	2	1		1	1	
	CLED								9	22	23	1	1				5
Nalidixin-säure	Urin									1	7	25	14	11			3
	CLED								8	34	12	1	1	3	1		1
Pipemid-säure	Urin										1	23	21	8	2	1	5
	CLED							3	31	22		2	2	1			
MK-0366	Urin						3	8	7	23	12	6	2				
	CLED		18	25	12		1	4	1								

TABELLE 5 b

Minimale Hemmkonzentrationen von Cinnoxacin, Nalidixinsäure, Pipemidsäure und MK gegenüber INDOL POSITIV PROTEUSSTÄMMEN (n = 17)

(CLED-, Urin-Agar-Plattentest)

mg/l

Substanz	Medium	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
Cinnoxacin	Urin							1	13	2					1		
	DST							2	9	5							1
Nalidixin-säure	Urin									1	6	4	4	2			
	DST							5	7	4			1				
Pipemid-säure	Urin									5	2	3	4	2			1
	DST							12	4				1				
MK-0366	Urin					1	2	1	7	3	2	1					
	DST		11	3	1		1	1									

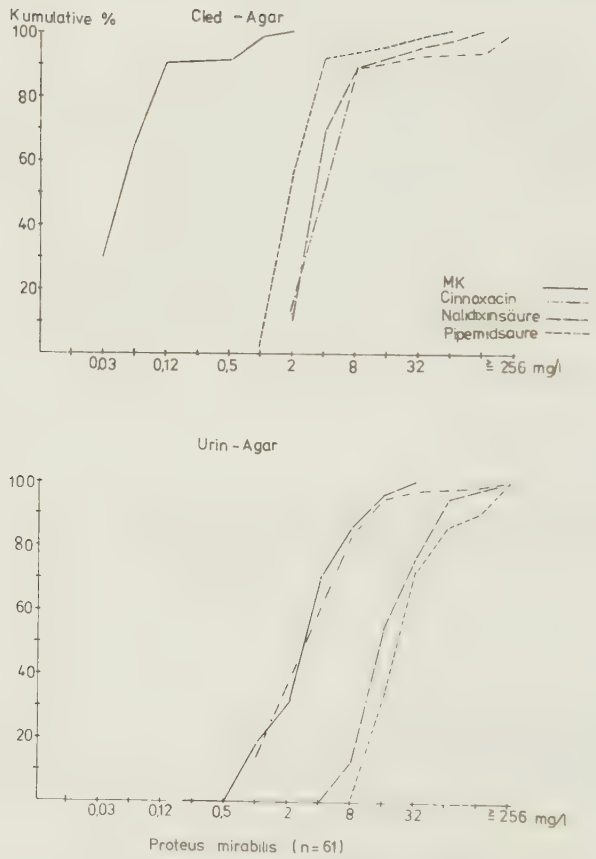


Abbildung 5

Minimale Hemmkonzentrationen von Norfloxacin,Cinnoxacin,Pipemidsäure und Nalidixinsäure gegenüber Proteus Indol negativ (n=61; DST-,Urin-Agar).

TABELLE 5 c

Minimale Hemmkonzentration von
Cinnoxacin, Nalidixinsäzre, Pipemidsäure und MK
gegenüber Indos positiven PROTEUS STÄMMEN

(CLED-, Urin-Agar-Plattentest)

Gattung	Stamm	Cinnoxacin		Nalidixinsäure		Pipemidsäure		M K	
		Urin	CLED	Urin	CLED	Urin	CLED	Urin	CLED
Proteus morganii	670	2	4	8	4	4	2	0,5	0,5
	1572	2	2	4	2	8	1	0,2	0,03
Proteus rettgeri	1482	4	2	32	4	8	2	2	0,12
	2308	64	> 256	64	32	>256	32	16	1
	4270	2	2	16	2	32	1	4	0,03
Proteus vulgaris	4462	2	4	8	1	4	2	0,5	0,06
	1745	2	4	8	1	4	1	1	0,06
	2630	2	1	8	2	16	1	8	0,03
	9745	1	1	4	1	16	1	2	0,03
	1155	4	4	16	2	64	1	8	0,03
	6953	2	1	32	1	32	1	2	0,03
	3493	2	2	32	2	4	1	2	0,03
	974	4	2	8	2	4	1	2	0,03
	3771	2	2	32	4	16	2	2	0,06
	1846	2	2	16	4	32	1	4	0,03
	3765	2	2	16	2	32	1	4	0,03
	9689	2	2	8	1	64	1	2	0,03

f) Serratia und Citrobacter freudii

Bei 13 Serratia-Stämmen und 15 Citrobacter freudii-Stämmen wurde die minimale Hemmkonzentration bestimmt.

Die Ergebnisse der Bestimmungen enthält Tabelle 6 a bzw. 6 b.

Aus ihnen läßt sich eine vergleichsweise gute Hemmfähigkeit gegenüber beiden Gattungen auf DST-Agar ablesen. Für eine 90 %ige Hemmung der Serratia benötigt man 128 mg/l Cinnoxacin und Nalidixinsäure, 32 mg/l Pipemidsäure und 1 mg/l Norfloxacin. Auf Urin-Agar braucht man 32 mg/l Cinnoxacin und Nalidixinsäure, 64 mg/l Pipemidsäure und 8 mg/l Norfloxacin.

Über 90 % der Citrobacter-Stämme werden von 16 mg/l Cinnoxacin, 32 mg/l Naldixinsäure, 8 mg/l Pipemidsäure und 0,5 mg/l Norfloxacin gehemmt.

Einen Wirkungsverlust zeigte lediglich Norfloxacin auf Urin-Agar.

TABELLE 6 a

Minimale Hemmkonzentrationen von
Cinnoxacin, Nalidixinsäure, Pipemidsäure und MK
gegenüber SERRATIA SPEZIES (n = 13)

(DST-, Urin-Agar-Plattentest)

mg/l

Substanz	Medium	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	>256
Cinnoxacin	Urin							1	1	1	2	3	4			1	
	DST								1	6	3				2	1	
Nalidixin-säure	Urin								1	2	4	3	2			1	
	DST								2	7	1				2		1
Pipemid-säure	Urin									2	4	4	1	1	1		
	DST							1	6	1	2	1	1			1	
MK-0366	Urin							4	3	2	3	1					
	DST		1	2	3	2	3	1	1								

TABELLE 6 b

Minimale Hemmkonzentrationen von
Cinnoxacin, Nalidixinsäure, Pipemidsäure und MK
gegenüber CITROBACTER FREUDII (n = 15)

(DST, Urin-Agar-Plattentest)

mg/l

Substanz	Medium	0,015	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
Cinnoxacin	Urin							1	6	6		1		1	
	DST								1	10		3		1	
Nalidixin-säure	Urin								2	10		2		1	
	DST								11	2			1		1
Pipemid-säure	Urin								6	7		2			
	DST								11	2	1	1			
MK-0366	Urin								1	6	5	2	1		
	DST		2	8	1	1	2	1							

2. Vergleich der MHK in flüssigem und auf festem Medium

Es wurde eine MHK-Bestimmung von Norfloxacin parallel auf Müller-Hinton-Agar und in Müller-Hinton-Bouillon durchgeführt. Dazu standen je sechs Escherichia coli, vier Enterobacter cloacae, fünf Klebsiella pneumoniae und fünf Pseudomonas aeruginosa zur Verfügung. Die Einsaat betrug $1o^7$ Keime. Die folgende Tabelle enthält die MHK, sowie das geometrische Mittel der MHK jeder der untersuchten Gattungen. Aus ihr wird ersichtlich, daß im flüssigen Medium die MHK höher ist.

TABELLE 7

Gattung	Nr.	MHK in MHA	MHK in MHB
Escherichia coli	6363	0,06	0,12
	6695	0,03	0,12
	1906	0,03	0,12
	990	0,03	0,25
	3c	0,03	0,06
	7c	0,06	0,5
geometrisches Mittel		0,0378	0,1533
Enterobacter cloacae	20	0,06	1
	1844	0,12	1
	4286	0,06	0,5
	2448	0,12	0,5
geometrisches Mittel		0,0849	0,7071
Klebsiella pneumoniae	9473	0,12	0,25
	550	0,12	1
	9353	0,06	2
	1633	0,06	2
	Simdorn	0,06	2
geometrisches Mittel		0,0792	1,1487
Pseudomonas aeruginosa	Hensch	0,25	2
	6271	0,5	2
	1824	1	2
	2426	0,5	2
	34	0,5	2
geometrisches Mittel		0,5	2

3. Vergleich zweier verschiedener fester Medien

Um festzustellen, ob bei Norfloxacin eine Abhängigkeit der MHK von einem bestimmten festen Medium bestünde, wurde eine MHK-Bestimmung im Agardilutionsverfahren gleichzeitig auf DST- und Müller-Hinton-Agar durchgeführt. Als Keime dienten je 6 Escherichia coli, 5 Pseudomonas aeruginosa, 5 Klebsiella pneumoniae und 4 Enterobacter cloacae. Die Einsaat betrug 10^7 Keime. Wie sich aus der folgenden Tabelle ablesen läßt, werden 17 Keime bei der selben Konzentration gehemmt. 4 Keime weisen eine Differenz von einer Titerstufe auf.

TABELLE 8

Gattung	Nr.	MHK auf	
		MH-Agar	DST
Escherichia coli	6363	0,06	0,03
	6695	0,03	0,03
	1906	0,03	0,03
	990	0,03	0,03
	3c	0,03	0,06
	7c	0,06	0,06
geometrisches Mittel		0,0378	0,0378
Enterobacter cloacae	20	0,06	0,06
	1844	0,12	0,12
	4268	0,06	0,06
	2448	0,12	0,12
geometrisches Mittel		0,0849	0,0849
Klebsiella pneumoniae	9473	0,12	0,06
	550	0,12	0,12
	9353	0,06	0,06
	1633	0,06	0,06
	Simdorn	0,06	0,06
geometrisches Mittel		0,0792	0,0689
Pseudomonas aeruginosa	Hensch	0,25	0,25
	6271	0,5	0,5
	1821	1	0,5
	2426	0,5	0,5
	34	0,5	0,5
geometrisches Mittel		0,5	0,4353

4. EINSAATABHÄNGIGKEIT

Die Einsaatabhängigkeit von Norfloxacin wurde gegenüber 6 Escherichia coli, 4 Enterobacter cloacae, 5 Klebsiella pneumoniae, 5 Pseudomonas aeruginosa getestet. Die Einsaat betrug 10^5, 10^7, 10^9 Keime auf DST-Agar. Tabelle 9 gibt die Ergebnisse der Bestimmungen wieder.

Es konnte eine leichte Einsaatabhängigkeit festgestellt werden.

TABELLE 9

Gattung	Nr.	MHK in mg/l bei einer Keimeinsaat von 10^9	10^7	10^5
Escherichia coli	6263	0,06	0,03	0,03
	6695	0,06	0,03	0,03
	1906	0,06	0,03	0,03
	990	0,06	0,03	0,03
	3c	0,06	0,06	0,03
	7c	0,12	0,06	0,06
geometrisches Mittel		0,0673	0,0378	0,0337
Enterobacter cloacae	2o	0,06	0,06	0,06
	1844	0,25	0,12	0,12
	4267	0,06	0,06	0,06
	2448	0,25	0,12	0,12
geometrisches Mittel		0,1225	0,0849	0,0849
Klebsiella pneumoniae	9473	0,12	0,06	0,03
	550	0,06	0,06	0,06
	9353	0,12	0,06	0,06
	1633	0,12	0,06	0,06
	Simdorn	0,12	0,06	0,06
geometrisches Mittel		0,1045	0,06	0,0522
Pseudomonas aeruginosa	Hensch	0,25	0,25	0,25
	6271	0,5	0,5	0,5
	1821	0,5	0,5	0,5
	2426	0,5	0,5	0,5
	34	0,5	0,5	0,5
geometrisches Mittel		0,4353	0,4353	0,4353

5. Die subinhibitorische Aktivität von Norfloxacin

Die subinhibitorische Aktivität von Norfloxacin wurde an 9 ausgewählten Keimen verschiedener Spezies untersucht. Die Untersuchung fand in MHB und Urin statt.

Wir ermittelten den subinhibitorischen Wirkungsbereich durch Bestimmung der MAK; dies ist definiert als jene Konzentration, die das Bakterienwachstum derart verlangsamt, daß turbidiemetrisch eine um mindesten 10 Skalenteile geringere Transmission gemessen wird. Das Verhältnis der minimal aktiven Konzentration zur minimalen Hemmkonzentration ist das Maß für die subinhibitorische Aktivität eines Chemotherapeutikums gegenüber der jeweiligen Keimart.

Die Ergebnisse sind der Tabelle 10 zu entnehmen:

10 a subinhibitorische Aktivität in Müller-Hinton-Bouillon

und

10 b subinhibitorische Aktivität in Urin

Im Anschluß daran sind die Verläufe der dazugehörigen Versuche graphisch dargestellt.

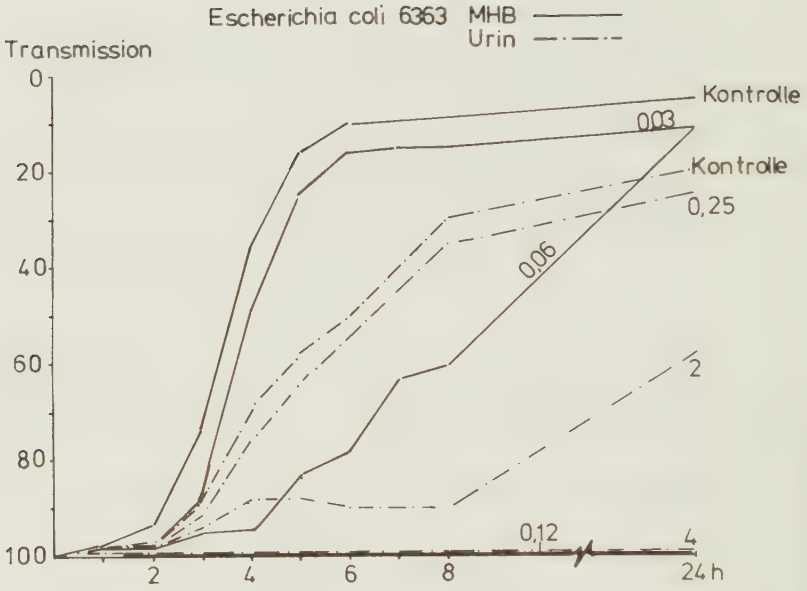


Abbildung 6 a

Wirkung subinhibitorischer Konzentrationen von Norfloxacin auf E.coli (0,12mg/l in MHB; 4mg/l in Urin,turbidimetrische Messung).
a. Stamm 6363
b. Stamm 6695

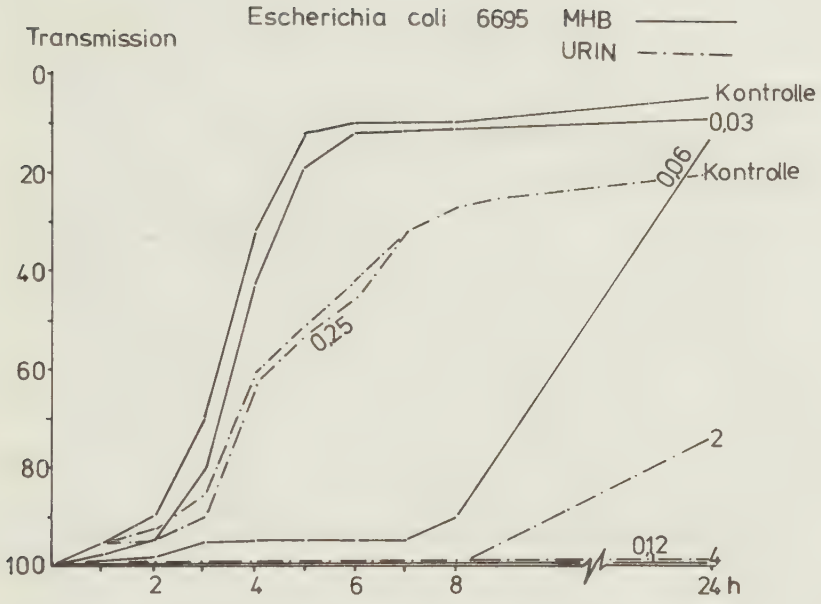


Abbildung 6b

Subinhibitorische Wirkung gegen E. coli
Die MHK gegenüber 6363 in MHB beträgt 0,12mg/l. 0,06mg/l führen noch zu einer deutlichen Wachstumshemmung. In Urin war die MHK 4mg/l. Die minimal aktive Konzentration beträgt 2mg/l. Stamm 6695 verhält sich genauso.

Abbildung 7a

Wirkung subinhibitorischer Konzentrationen von Norfloxacin auf Klebsiella pneumoniae.

a. Stamm 550 (MHK: 1mg/l in MHB ; 16mg/l inUrin)

b. Stamm 9473 (MHK:0,25mg/l in MHB;8mg/l in Urin)

(turbidimetrische Messung)

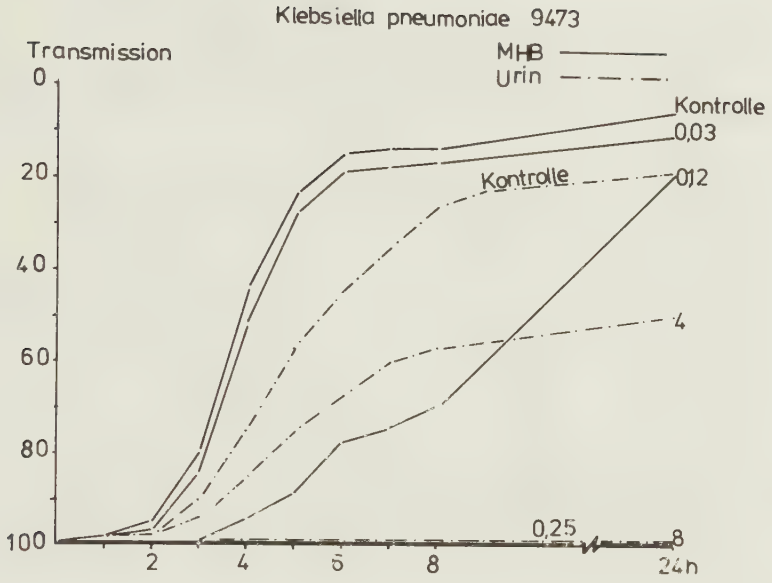
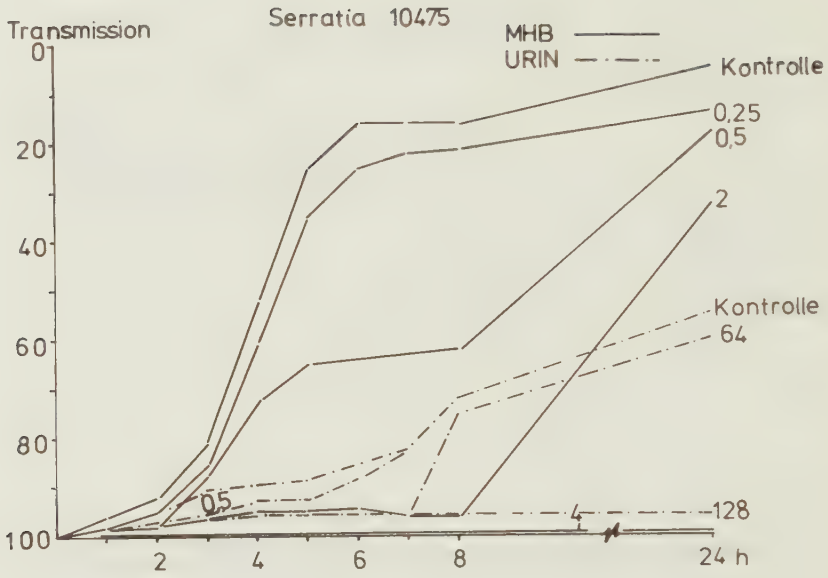


Abbildung 7b

Subinhibitorische Wirkung gegen Klebsiella pneumoniae
Untersucht wurden vergleichend 2 Stämme sowohl in MHB als auch in Urin.Der Quotient MAK:MHK beträgt bei Stamm 9473 1:2 in beiden Medien;bei Stamm 550 1:8 in MHB, 1:4 in Urin.



Abbildunng 8

Wirkung subinhibitorischer Konzentrationen von Norfloxacin auf Serratia marescens (MHK:4mg/l in MHB; 128mg/l in Urin,turbidimetrische Messung).

Subinhibitorische Wirkung gegen Serratia marescens

Bei dem untersuchten Stamm 10475 beträgt die MHK 4mg/l in MHB,bereits bei 0,5mg/l ist die minimal aktive Konzentration erreicht,so daß das Verhältniss MAK:MHK 1:8 beträgt.In Urin sind MAK und MHK gleich.

TABELLE 10 a

Minimale Hemmkonzentration (MHK) und minimal aktive Konzentration(MAK) von Norfloxacin gegenüber verschiedenen Bakterienstämmen in MHB.

Keim	Stamm	MHK mg/l	MAK mg/l	MAK:MHK
E.coli	6363	0,12	0,06	1:2
	6695	0,12	0,06	1:2
Klebsiella pneumoniae	9473	0,25	0,12	1:2
	550	1	0,12	1:8
E.cloacae	1044	1	0,5	1:2
	20	1	0,5	1:2
Serratia marescens	10475	4	0,5	1:8

TABELLE 10 b

Minimale Hemmkonzentration(MHK) und minimal aktive Konzentration(MAK) von Norfloxacin gegenüber verschiedenen Bakterienstämmen in Urin.

Keim	Stamm	MHK mg/l	MAK mg/l	MAK:MHK
E.coli	6363	4	2	1:2
	6695	4	2	1:2
Klebsiella pneumoniae	9473	8	4	1:2
	550	16	4	1:4
E.cloacae	1844	32	16	1:2
	20	16	8	1:2
Serratia marescens	10475	128	128	1:1

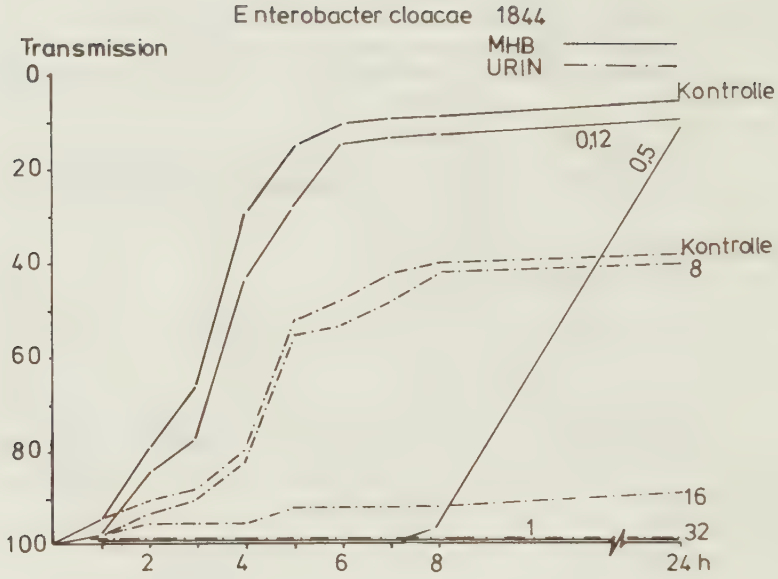


Abbildung 9 a

Wirkung subinhibitorischer Konzentrationen von Norfloxacin auf E. cloacae(turbidimetrische Messung).

a. Stamm 1844 (MHK:1mg/l in MHB; 32mg/l in Urin)

b. Stamm 20 (MHK:1mg/l in MHB; 16mg/l in Urin)

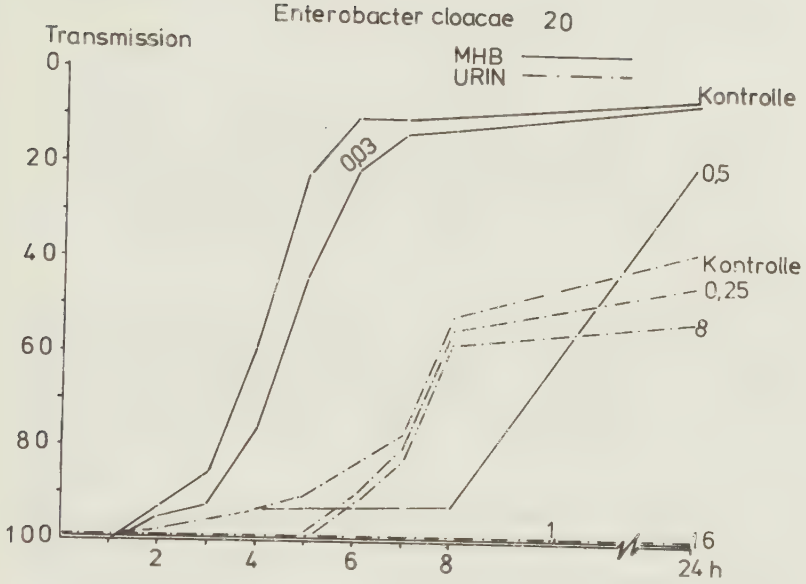


Abbildung 9b

Subinhibitorische Wirkung gegen E. cloacae
Bei den vergleichend untersuchten Stämmen zeigte sich der subinhibitorische Wirkungsbereich in MHB und Urin gleich.Das Verhältniss MAK:MHK beträgt 1:2.

6. Die Wirkung von Norfloxacin auf Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase

Mit den folgenden Versuchen soll die Fähigkeit von Norfloxacin untersucht werden das Bakterienwachstum unmittelbar zu stoppen, wenn das Medikament in der logarithmischen Wachstumsphase zugegeben wird.

Auch diese Untersuchung wurde nach dem Trübungsmeßverfahren durchgeführt und als minimal optimale Konzentration (MOK) jene bestimmt, die in der logarithmischen Wachstumsphase eine weitere Trübungszunahme am Photometer verhinderte.

Dazu wurden 12 ausgewählte Stämme verschiedener Spezies verwandt. Die Untersuchungen fanden nur in MHB Müller-Hinton-Bouillon statt, da es durch die benötigten hohen Konzentrationen zu ausgefallenen Salzen im Urin kam, die eine turbidimetrische Messung im Eppendorf unmöglich machten.

Die Ergebnisse der Versuche finden Sie in Tabelle 11. Im Anschluß daran finden Sie die Versuchsabläufe in Abbildungen 9 a - 12 b.

TABELLE 11

Minimale Hemmkonzentration (MHK)
und minimal optimale Konzentration (MOK) von MK
gegenüber von verschiedenen Bakterien

Nr.	K e i m	MHK	MOK	MHK:MOK
6363	Escherichia coli	0,12	16	1 : 128
6695		0,12	16	1 : 128
990		0,25	16	1 : 64
1906		0,12	16	1 : 128
9353	Klebsiella	2	128	1 : 64
1633		2	128	1 : 64
9473		0,25	32	1 : 128
550		1	32	1 : 32
635	Enterobacter cloacae	1	32	1 : 32
2448		0,5	128	1 : 256
20		1	128	1 : 128
1844		1	128	1 : 128

Aus Tabelle 11 entnehmen wir, daß das Verhältnis MHK : MOK sehr ungünstig ist. Erst sehr hohe Konzentrationen führen zu einem sofortigen Wachstumsstop.

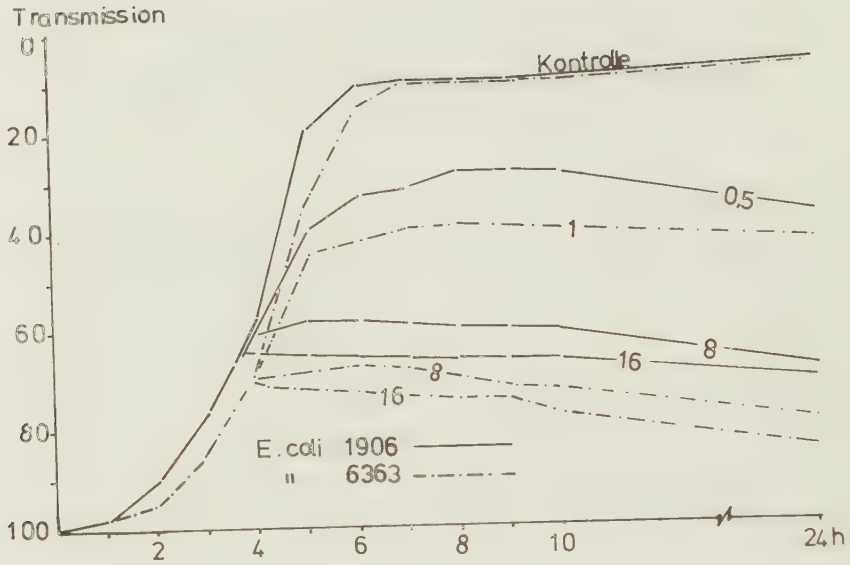


Abbildung 10 a

Wirkung von Norfloxacin auf E.coli in der logarithmischen Wachstumsphase(turbidimetrische Messung in MHB)

a. Stamm 1906 MHK:0,12mg/l
   Stamm 6363 MHK:0,12mg/l

b. Stamm 990 MHK:0,25mg/l
   Stamm 6695 MHK:0,12mg/l

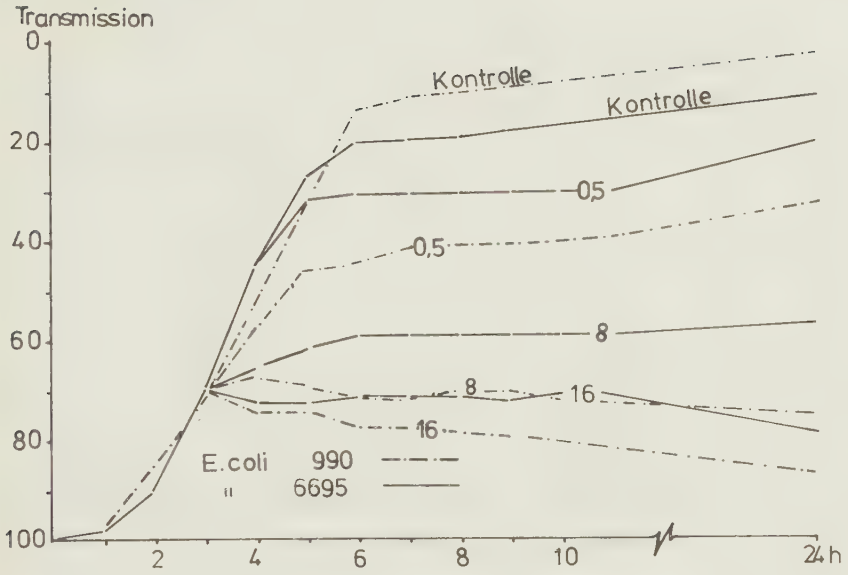


Abbildung 10b

Aus den Abbildungen 10a und b geht hervor,daß Norfloxacin gegenüber den untersuchten 4 E.coli Stämmen erst bei 16mg/l zu einem Wachstumsstop der Bakterien führt.Die MOK ist 64 bzw. 128 mal so hoch wie die MHK.Bei keinem Stamm kommt es zu einer Lyse der Bakterien.

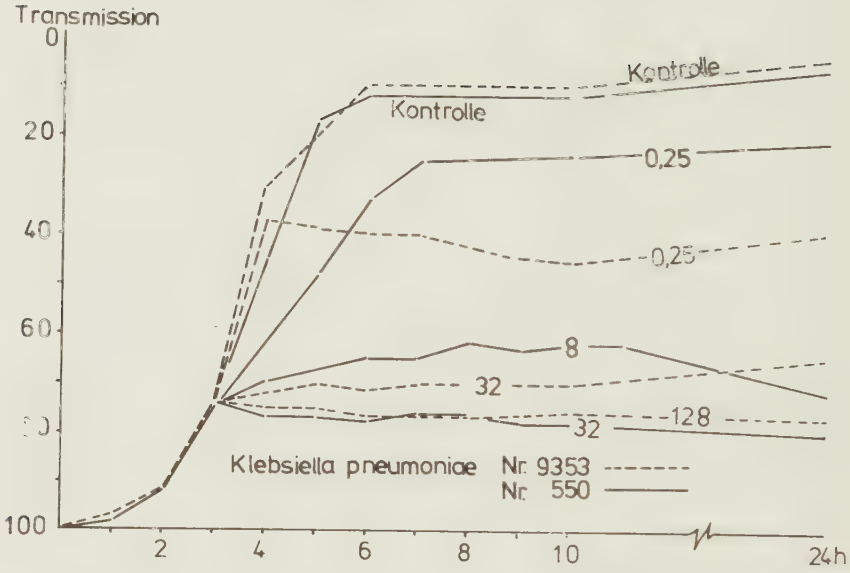


Abbildung 11 a

Wirkung von Norfloxacin auf Klebsiella pneumoniae in der logarithmischen Wachstumsphase(turbidimetrische Messung in MHB)

a. Stamm 9353 MHK:2mg/l

. Stamm 550 MHK:1mg/l

b. Stamm 1633 MHK:2mg/l

Stamm 9473 MHK:0,25mg/l

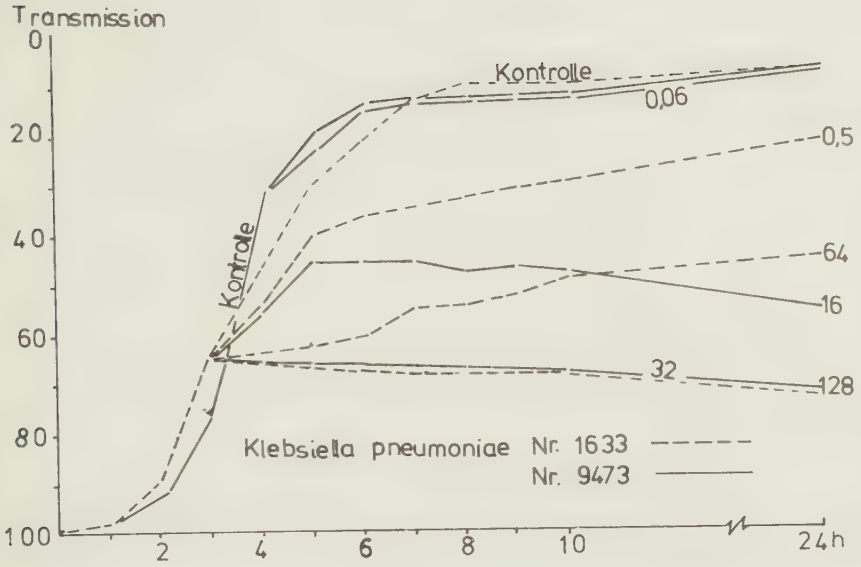


Abbildung 11b

Auch bei den 4 untersuchten Klebsiella pneumoniae ist das Verhältniss MOK:MHK sehr ungünstig.Es beträgt 32:1 bei Stamm 550,64:1 bei den Stämmen 9353 und1633 sowie 128:1 bei Stamm 9473.Das Medium blieb beim Zusatz hoher Konzentrationen Norfloxacin trübe.

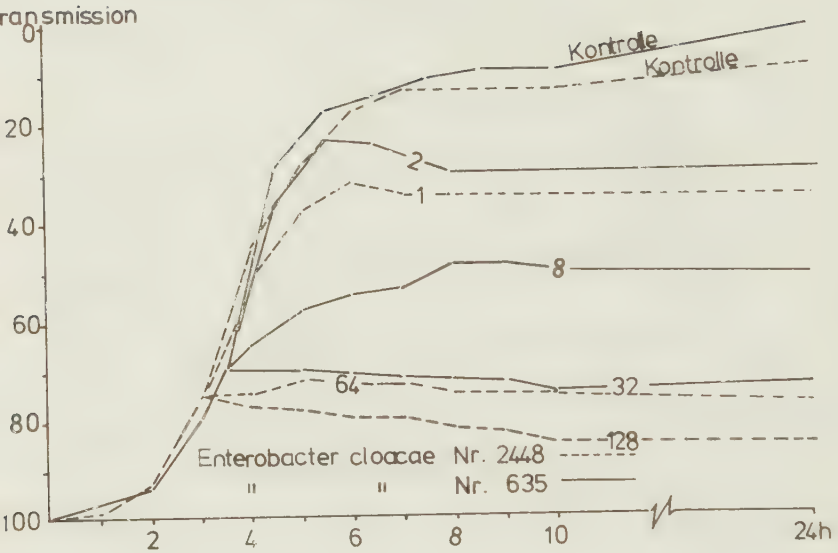


Abbildung 12a

Wirkung von Norfloxacin auf Enterobacter cloacae in der logarithmischen Wachstumsphase (turbidimetrische Messung in MHB)

a. Stamm 2448 MHK:0,5mg/l
   Stamm 635 MHK:1 mg/l

b. Stamm 20 MHK:1 mg/l
   Stamm 1844 MHK:1mg/l

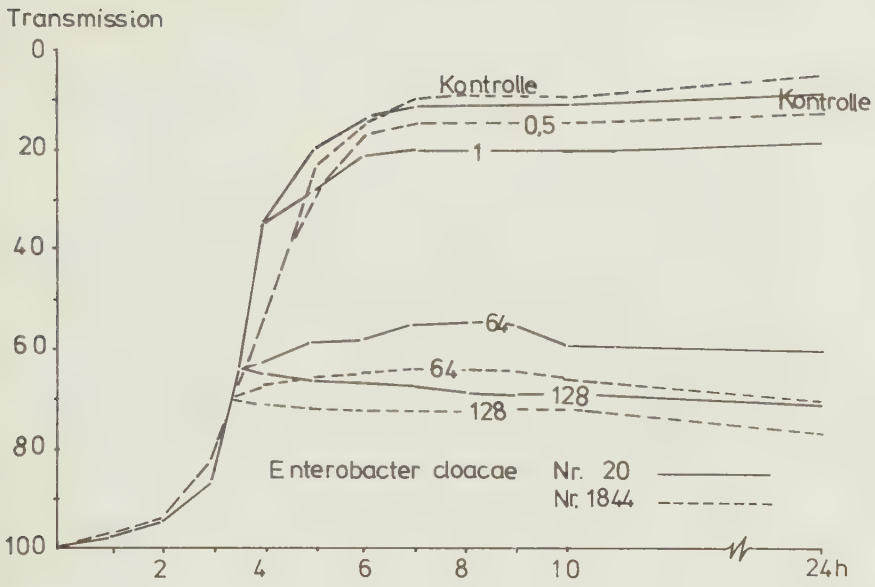


Abbildung 12b

Die stellvertretend für die Gattung E.cloacae untersuchten 4 Stämme werden erst durch Konzentrationen in ihrem Wachstum gestoppt,die dem 32-256fachen der MHK entsprechen,ohne das es zu einer Lyse der Bakterien kommt.

7. Kinetik der Bakterizidie

a) Escherichia coli

Es wurden zwei Stämme jeweils in Urin und in Müller-Hinton-Bouillon untersucht. Die Konzentration betrug 0,25 /l in MHB, sowie 8 mg/l in Urin; diese Konzentrationen entsprachen der doppelten MHK im flüssigen Medium. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 12 zu entnehmen; die 99 %ige Abtötungszeit der Keime wurde aus der abgebildeten graphischen Darstellung ermittelt. Die Abtötung im Urin erfolgte langsamer als in MHB; auch die Zeit, die benötigt wurde um eine 99 %ige Abtötung zu erreichen, war verlängert.

TABELLE 12

Kinetik der Bakterizidie von Norfloxacin
gegenüber Escherichia coli
in Müller-Hinton-Bouillon (M) und Urin (U)
Membranfiltration

Stamm	Medium	MHK mg/l	Einwaage mg/l	Einsaat Keime/ml	überlebende Keime in % der Einsaat						T 99%
					0,5	1	2	4	8	24	
6363	M	0,12	0,25	$1{,}18 \times 10^5$	24,57	1,86	0,59	0,16	0,03	0	90 Min.
	U	4	8	$1{,}28 \times 10^5$	6,02	2,58	1,01	0,47	0	0	120 Min.
6695	M	0,12	0,25	$5{,}9 \times 10^5$	42,37	3,55	1,15	0,02	0	0	125 Min.
	U	4	8	$4{,}6 \times 10^5$	23,91	7,39	3,47	0,17	0	0	170 Min.

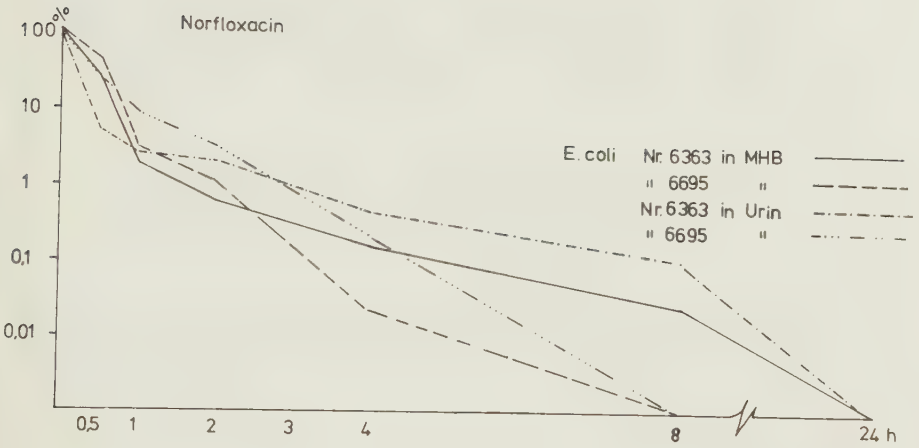


Abbildung 13

Kinetik der Bakterizidie von 0,25mg/l Norfloxacin in MHB und 8mg/l in Urin gegenüber E. coli. (Membranfiltration)

b) Enterobacter cloacae

Ermittelt wurde der Bakterizidieverlauf bei 2 Stämmen von Enterobacter cloacae in Urin und MHB.

Für Enterobacter cloacae 1844 betrug in Urin die Einwaage 64 mg/l, für Enterobacter cloacae Nr. 20 32 mg/l. Für MHB wurde für beide Stämme 2 mg/l genommen. Das entsprach der doppelten Konzentration der MHK.

Die Ergebnisse sind aus der Tabelle 13 zu entnehmen, die 99 %ige Abtötungszeit wurde aus der entsprechenden graphischen Darstellung abgelesen.

Die Abtötung im Urin erfolgte verzögert, für eine 99 %ige Abtötung wird etwa die doppelte Zeit benötigt.

TABELLE 13

Kinetik der Bakterizidie von Norfloxacin gegenüber Enterobacter cloacae in Müller-Hinton-Bouillon (M) und Urin (U) Membranfiltration

Stamm	Medium	MHK mg/l	Einwaage mg/l	Einsaat Keime/ml	überlebende Keime in % der Einsaat						T 99 %
					0,5	1	2	4	8	24	
1844	M	1	2	$3,7 \times 10^5$	70,27	7,56	0,75	0,3	0	0	115 Min.
	U	32	64	$3,5 \times 10^5$	57,14	27,71	10	1,2	0	0	243 Min.
20	M	1	2	$1,8 \times 10^5$	18,3	3,4	1,01	0,27	0,05	0	120 Min.
	U	16	32	$9,8 \times 10^4$	57,14	39,79	7,35	2,14	0,06	0	295 Min.

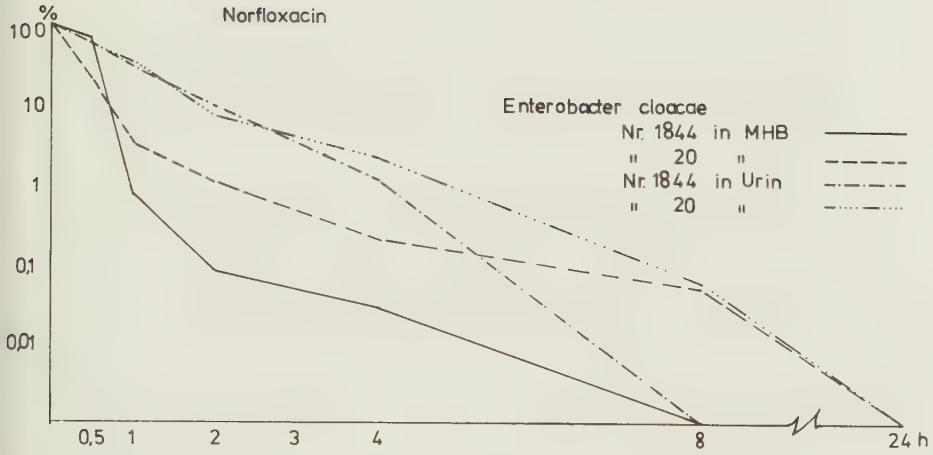


Abbildung 14

Kinetik der Bakterizidie von 2mg/l Norfloxacin in MHB und 64mg/l für Stamm 1844,bzw. 32mg/l für Stamm 20 in Urin gegenüber E. cloacae.
(Membranfiltration)

c) Klebsiella pneumoniae

In Urin und MHB wurde die Kinetik der Bakterizidie von Norfloxacin gegenüber Klebsiella pneumoniae untersucht.

Hier ist die Abtötung in Urin gegenüber der in MHB beschleunigt, auch die 99 %ige Abtötungszeit ist kürzer.

Die Tabelle 14 und die graphische Darstellung geben Auskunft über Ergebnisse und den Versuchsverlauf.

Auch hierbei wurde die Wirkung von doppelter MHK untersucht.

TABELLE 14

Kinetik der Bakterizidie von Norfloxacin gegenüber Klebsiella pneumoniae in Müller-Hinton-Bouillon (M) und Urin (U) Membranfiltration

Stamm	Medium	MHK mg/l	Einwaage mg/l	Einsaat Keime/ml	überlebende Keime in % der Einsaat						T 99 %
					0,5	1	2	4	8	24	
550	M	1	2	$4,6 \times 10^5$	63,04	1,6	0,85	0,12	0,01	0	120 Min.
	U	16	32	$6,6 \times 10^5$	41,6	5,9	0,6	0,04	0	0	110 Min.
9473	M	0,25	0,5	$2,9 \times 10^5$	48,27	21,03	4,48	0,34	0	0	195 Min.
	U	8	16	$1,3 \times 10^5$	76,15	23,84	0,3	0,03	0	0	100 Min.

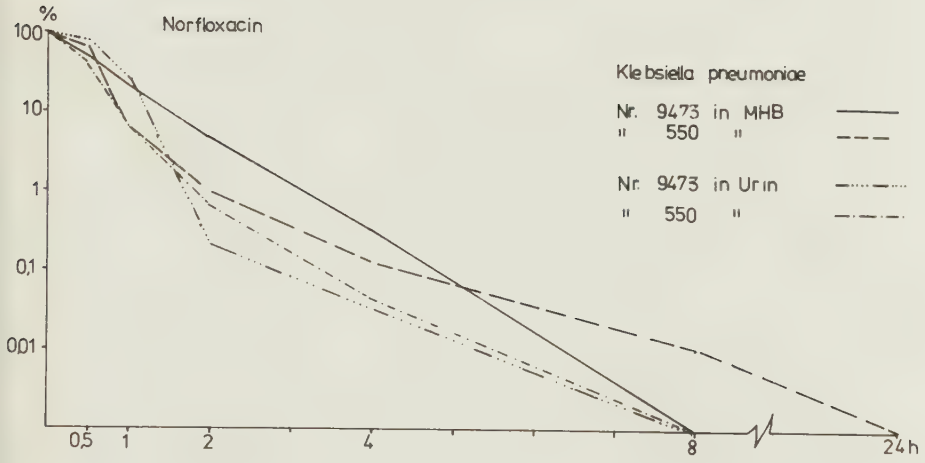


Abbildung 15

Kinetik der Bakterizidie von 2mg/l (Stamm 550) und 0,25mg/l (Stamm 9473) Norfloxacin in MHB und 16mg/l (Stamm 550),bzw. 8mg/l (Stamm 9473) in Urin gegenüber Klebsiella pneumoniae.
(Membranfiltration)

IV. DISKUSSION

Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen,daß Norfloxacin auf herkömmlichem Medium (DST-Agar) eine weitaus höhere Aktivität gegenüber den bei Harnwegsinfektionen häufigen fakultativ pathogenen Enterobacteri acae,sowie Pseudomonas aeruginosa besitzt,als die Vergleichsubstanzen.Die minimalen Hemmkonzentrationen von Norfloxacin bewegen sich in den Größenordnungen von 0,25mg/l bei E.coli bis hin zu 4mg/l bei Pseudomonas aeruginosa.Die 90% Hemmfähigkeit gegenüber Enterobacteriacae und Pseudomonas aeruginosa ist der Tabelle 15 zu entnehmen.
Gegenüber E.coli ist Norfloxacin im DST-Agar die aktivste Substanz,gefolgt von Pipemidsäure und Cinnoxacin,die beide bei 4mg/l eine 90% Hemmung erzielen;Nalidixinsäure hat die geringste Aktivität mit 8mg/l,das ist 32 mal soviel wie Norfloxacin.Zur 90% Hemmung von E.cloacae und Klebsiella pneumoniae benötigt Norfloxacin ebenfalls 0,25mg/l und damit nur 1/8 bzw. 1/16 von Pipemidsäure,1/16 bzw. 1/32 von Nalidixinsäure und jeweils 1/32 von Cinnoxacin.
Bei Proteus Spezies läßt sich feststellen,daß für Indol positive weniger Substanz benötigt wird (0,12mg/l Norfloxacin),als für Indol negative Stämme (0,5mg/l Norfloxacin),während die Vergleichsubstanzen für Indol positive Stämme jeweils 4mg/l,für Indol negative 4mg/l(Pipemidsäure),32mg/l(Cinnoxacin) und 16mg/l (Nalidixinsäure) benötigen.

Für Serratia marescens ist eine Konzentration von 1mg/l Norfloxacin zur 90% Hemmung ausreichend,gefolgt von Pipemidsäure,die 32 mal soviel Substanz und den beiden anderen Chemotherapeutika,die 128 mal soviel benötigen.Citrobacter freudii kann mit 0,5mg/l gehemmt werden,das ist 1/16-1/64 der von den Vergleichsubstanzen benötigten Menge.

Besonders deutlich wird der Unterschied in der Aktivität der Der Substanzen gegenüber Pseudomonas aeruginosa.4mg/l Norfloxacin hemmen 90% der Stämme,Pipemidsäure benötigt dazu 128mg/l,Cinnoxacin und Nalidixinsäure erzielen bei einer Konzentration von 256mg/l noch keine 90% Hemmung.Die Ergebnisse stehen im Einklang mit den Resultaten anderer Autoren(2,7,12,17).

Im Medium Urin erlitten sämtliche Substanzen einen deutlichen Wirkungsverlust.Bereits 1976 berichteten Shah et al. über den Verlust der antibakteriellen Aktivität von Penicillinen und Cephalosporinen in Urin gegenüber Enterobacteriacae.Dieser Verlust betrug bis zu 1/32 der ursprünglichen Aktivität(19).

Der Wirkungsverlust von Norfloxacin in Urin ist teilweise so groß,daß es seinen Wirkungsvorsprung gegenüber den Vergleichsubstanzen einbüßt.Zur 90% Hemmung von E.coli benötigt man ebensoviel Norfloxacin wie Nalidixinsäure(16mg/l),das ist das Doppelte der von Cinnoxacin benötigten Menge.Auch bei Proteus Spezies ist Cinnoxacin doppelt so aktiv.Bei allen anderen Bakteriengattungen beträgt die Aktivität von Norfloxacin mindestens das 2fache der anderen Substanzen.

Gegenüber Pseudomonas aeruginosa vermag nur Norfloxacin eine 90% Hemmung auf Urin-Agar.

39 der über 400 Stämme waren resistent gegen eine oder mehrere der Vergleichsubstanzen bei einer Dosis von 256mg/l.Norfloxacin erfaßte diese sowohl auf DST-Agar,wie auch in Urin.

TABELLE 15

90% Hemmfähigkeit von Norfloxacin,Pipemidsäure,Cinnoxacin und Nalidixinsäure gegenüber verschiedenen Keimen (DST-,Urin-Agar).

Keim	Medium	Norfloxacin	Pipemidsäure	Cinnoxacin	Nalidixinsäure
		mg/l			
E.coli (n=97)	DST	0,25	4	4	8
	Urin	16	64	8	16
E.cloacae (n=68)	DST	0,25	2	8	4
	Urin	4	16	32	16
Klebsiella pneumoniae (n=87)	DST	0,25	4	8	8
	Urin	16	128.	32	32
Proteus Indol neg. (n=61)	CLED	0,5	4	32	16
	Urin	16	256	8	64
Proteus Indol pos. (n=18)	CLED	0,12	4	4	4
	Urin	8	64	4	32
Serratia marescens (n=13)	DST	1	32	128	128
	Urin	8	64	32	32
Citrobacter freudii (n=15)	DST	0,5	8	16	32
	Urin	8	8	16	32
Pseudomonas aeruginosa (n=50)	DST	4	128	--	--
	Urin	64	--	--	--

Bei Norfloxacin besteht keine nennenswerte Abhängigkeit der MHK vom verwendeten festen Medium,wie die Bestimmung im Agardilutationsverfahren auf DST- und Müller-Hinton-Agar ergab.Die geometrischen Mittel der MHK bei E.coli und E.cloacae entsprechen sich auf beiden Nährböden.Die Aktivität gegenüber Klebsiella pneumoniae ist um den Faktor 1,486 auf DST-Agar,gegenüber Pseudomonas aeruginosa um den Faktor 0,8705 auf DST-Agar im Gegensatz zu Müller-Hinton-Agar stärker.Eine unterschiedlich starke Aktivität läßt sich vorallem im flüssigen bzw. festen Testmedium für Norfloxacin feststellen.Bei Untersuchungen auf Müller-Hinton-Agar lag die MHK drei Titerstufen niedriger als in Müller-Hinton-Bouillon.

Sabath et al. stellten eine Einsaatabhängigkeit von Beta-Lactam Antibiotika gegenüber Staphylokokken fest(10,14).Die Aktivität von Norfloxacin gegenüber Enterobacteriacae konnte durch Einsaaterhöhung nur geringfügig verändert werden.Sie betrug für E.coli, E.cloacae und Klebsiella pneumoniae weniger als eine Titerstufe;für Pseudomonas aeruginosa besteht keine Einsaatabhängigkeit.Dies bestätigt die Untersuchungen von Ito et al.,die die Einsaatabhängigkeit von Norfloxacin als noch geringer als die von Pipemidsäure und Nalidixinsäure angibt.(7)

Will man die antibakterielle Aktivität eines Antibiotikums über die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration hinaus charakterisieren,ergibt die Untersuchung der subinhibitorischen Aktivität wertvolle Hinweise.Im Gegensatz zu Tetracyclin,bei dem noch

Konzentrationen,die 1/8 bis 1/128 der MHK entsprechen eine Partialhemmung verursachen,ist die subinhibitorische Breite von Norfloxacin gering(18).Die Partialhemmung findet bei 1/2 MHK statt.Die Ergebnisse in Müller-Hinton-Bouillon und Urin entsprechen sich.Dieser Bereich entspricht dem von Penicillin und Cephalosporinen(6).

Untersuchungen der Wirkungsweise von Antibiotika in der logarithmischen Wachstumsphase geben weitere Hinweise auf die Aktivität von Norfloxacin.Die wichtigste Größe in diesen Versuchen ist die minimal optimale Konzentration "MOK".Aus unseren Versuchen geht hervor,daß die lytische Aktivität von Norfloxacin nicht sehr ausgeprägt ist.Tabelle 10 gibt das ungünstige Verhältniss MHK:MOK wieder. Konzentrationen von 64 mal MHK reichten nicht aus um eine Klärung der Kultur zu erreichen,wie wir sie z.B. von Cefazolin her kennen (17).In Subkulturen von einigen dieser noch trüben Reagenzgläser konnten jedoch keine lebensfähigen Keime nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Kinetik der Bakterizidie von Norfloxacin zeigen eine gute Korrelation zu den Ergebnissen der Bestimmungen der minimalen Hemmkonzentrationen.Wie aus der Bestimmung der 99% Abtötungszeit hervorgeht,zeigte sich Norfloxacin als sehr bakterizid gegenüber E.coli,E.cloacae und Klebsiella pneumoniae,und zwar sowohl im herkömmlichen Medium,wie auch in Urin.Eine 99% Keimreduktion gibt Tabelle 16 wieder.Die Einwaage betrug 2x MHK.

TABELLE 16

99% Abtötungszeit von Bakterien bei 2x MHK
(in Urin und Müller-Hinton-Bouillon)

Keim	Stamm	99% Abtötungszeit/min	Medium
E.coli	6363	90	MHB
		120	Urin
	6695	125	MHB
		170	Urin
E.cloacae	1488	115	MHB
		243	Urin
	20	120	MHB
		295	Urin
Klebsiella pneumoniae	550	120	MHB
		110	Urin
	9473	195	MHB
		100	Urin

Der bakterizide Effekt von Norfloxacin tritt in Urin gegenüber E.coli und E.cloacae mit einer zeitlichen Verzögerung auf,im Gegensatz dazu erfolgt die 99% Hemmung gegenüber Klebsiella pneumoniae in Urin früher als in MHB.Bei keinem der getesteten Spezies kam es zu einem Auswachsen der Keime nach 24 Std..Ito et al. wiesen nach,daß Konzentrationen,die der MHK bzw. der doppelten MHK entsprechen, deutlich bakterizid sind.Die Bakterizidie nimmt jedoch mit sinkender Konzentration ab (7).
Die hier vorgelegten Untersuchungen zeigen,daß Norfloxacin gegenüber den wichtigsten Erregern von Harnwegsinfektionen im DST-Agar(dem Standart-Testmedium) sehr gute Aktivität besitzt,die die Akti-

vität der Vergleichsubstanzen weit übertrifft.In Urin ist der Wirkungsverlust von Norfloxacin so viel stärker als der der anderen untersuchten Chemotherapeutika,daß Norfloxacin gegenüber E.coli und Proteus spezies weniger aktiv ist als Cinnoxacin.Gegenüber E.cloacae,Klebsiella pneumoniae,Serratia marescens und Pseudomonas aeruginosa ist Norfloxacin deutlich aktiver als die Vergleichsubstanzen.Letztgenannte Gattung konnte nur von Norfloxacin auf Urin bei einer MHK von 64mg/l zu 90% gehemmt werden,während Nalidixinsäure,Pipemidsäure und Cinnoxacin auch bei einer Einwaage von 256mg/l keine 90% Hemmung gelang.

V. ZUSAMMENFASSUNG

Ottnad-Walz, Maja

Thema: In vitro Aktivität von Norfloxacin im Nativmedium und Urin

Wir prüften die antibakterielle Aktivität von Norfloxacin gegenüber Enterobakterien und Pseudomonas aeruginosa im Vergleich zu Cinnoxacin, Nalidixinsäure und Pipemidsäure. Die Untersuchungen fanden auf herkömmlichem Medium und in Urin statt. Die Versuchsergebnisse auf DST-Agar zeigen Norfloxacin als hochwirksames Chemotherapeutikum. Auf DST-Agar werden die meisten Enterobakterien von Konzentrationen von 0,25 mg/l gehemmt, für Serratia marescens werden für eine 90 % Hemmung 1 mg/l, für Pseudomonas aeruginosa 4 mg/l benötigt, damit ist Norfloxacin deutlich aktiver als die Vergleichssubstanzen.

Der Wirkungsverlust in Urin ist bei Norfloxacin größer als bei den Vergleichsubstanzen. Es ist nur noch aktiver gegenüber Serratia marescens, E.cloacae, Klebsiella pneumoniae, wobei der Unterschied 1 - 2 Titerstufen beträgt (90 % Hemmung auf Urin 8 - 16 mg/l). Gegenüber Pseudomonas aeruginosa gelingt die 90 % Hemmung mit 64 mg/l.

39 Stämme, die von einem oder mehreren Vergleichsubstanzen von 256 mg/l nicht gehemmt wurden, erfaßt Norfloxacin. Für Norfloxacin besteht keine nennenswerte Abhängigkeit vom verwendeten festen Medium, jedoch ein Unterschied in der Aktivität auf festem oder flüssigen Medium, in letzterem liegt die MHK 3 Titerstufen höher. Die geringfügige Einsaatabhängigkeit beträgt weniger als eine Titerstufe. Die subinhibitorische Breite sowie die lytische Aktivität wurden im Trübungsmessverfahren ermittelt. Die Ergebnisse zeigen eine geringe subinhibitorische Breite in MHB und Urin, bei 1/2 MHK findet noch eine Partialhemmung statt. Die lytische Aktivität ist nicht ausgeprägt. Konzentrationen, die 64 x MHK entsprachen, führten zu keiner Lyse der Bakterien.

Versuche der Bakterizidie-Kinetik zeigen, daß Norfloxacin gegen Enterobakterien stark bakterizid ist, wobei die 99 % Abtötungszeit in Urin bei E.cloacae und E.coli deutlich länger als in MHB, bei Klebsiella pneumoniae kürzer als in MHB war. Keiner der Keime wuchs nach 24 Stunden aus.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

1 Atlas E.,Clark H.,Silverblatt F.,Turck M.

Nalidixic acid and oxolinic acid in the treatment of chronic bacteriuria.
Ann.Intern.Med.70:713-721 1969

2 Buchbinder,M.J.C.Webb,L.V.Anderson,W.R.McCobe

Laboratory studies and clinical pharmacology of nalidixic acid.(Win 18,320)p.308-317
Antimicrob.Agents Chemother. 1962

3 Garrot L.P.,Waterworth P.M.

Effekt of medium compositum on the apparent sensivity of Pseudomonas aeruginosa to gentamycin.
J.clin.Path.22 (1969)534.

4 Helm E.B.

Antibakterielle Aktivität von Antibiotika in Körperflüssigkeiten.

5 Hemmel

Die Wirkung subinhibitorischer Konzentrationen von Antibiotika gegenüber E.coli und Klebsiella pneumoniae.
Dissertation 1974

6 Hubener

Untersuchungen über die zeitlich limitierte Einwirkung von Penicillin und Cephalosporinen auf fakultativ pathogene Keime.
Dissertation 1976

7 Ito A.,Hirai K.,Inoue M.,Koga H.,Suzue S.,Irikura T.,Mitsuhaschi S.
In vitro Antibacterial Aktivity of AM-715,a new Nalidixic Acid Analog.
Antimicrob.Agents et Chemother.Febr.1980 p.103-108

8 Junghaus

Untersuchungen über die Dosis-Wirkungsrelation der Bakterizidie bei E.coli,Klebsiella pneumoniae

und Staphylokokkus aureus.
Dissertation 1972

9 Klein P.

Bakteriologische Grundlagen der chemotherapeutischen Laboratoriumspraxis
Berlin,Göttingen,Heidelberg 1957

10 Noguchi H.,Kuto M.,Kurashige S.,Mitsuhaschi S.

Antibacterial activity of apalcillin (PC 904) against gram negativ bacilli,especelly ampicillin, carbenicillin and gentamicin-resistent clinical isolates.
Antimicrob.Agents Chemother. 12:745-752 1978

11 Overzill

Mikrobiologische Analytik
Verlag Hans Carl Nürnberg

12 Peters G.,Freiersleben H.,Marre R.,Metz H.,Tannenberg H.,Pulverer

Antibakterielle in-vitro Wirksamkeit von Pipemidsäure und Nalidixinsäure.
DMW 104,946 (1979)

13 Reifart N.

Kinetik der Bakterizidie von Antibiotika in Urin.
Dissertation Ffm. 1979

14 Sabath L.,Garner D.C.,Wilcox C.,Finland M.

Effect of inoculum and of betalactamase on the antistaphylococcal activity of 13 penicillins and cephalosporina.
Antimicrob,Agents Chemother. 8:344-349 1975

15 Schirmer K.P.

Untersuchungen der antibakteriellen Aktivität von Cefacolin.
Dissertation Ffm. 1976

16 Shah P.M.

Untersuchungen über die Kinetik der Bakterizidie

bei Enterobakterien.
Dissertation 1971

17 Shah P.M.,Helm B.E.,Stille W.

Untersuchungen zur antibakteriellen Aktivität von Cefacolin.
Infektion 1974

18 Shah P.M.,Stille W.

Über die antibakterielle Wirksamkeit subinhibitorischer Tetracyclinkonzentrationen.
Infektion 1973

19 Shah P.M.,Schirmer K.P.,Helm E.B.,Stille W.

Untersuchungen zur antibakteriellen Aktivität von Penicillinen und Cephalosporinen im Urin.
Arzneimittelforschung 9/1976

20 Vömel W.

Experimentelle Grundlagen der Entwicklung antibakterieller Chemotherapeutika.
Therapiewoche 20

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich,daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

IN VITRO AKTIVITÄT VON
NORFLOXACIN IM NATIVMEDIUM UND URIN

im Zentrum der Inneren Medizin (Infektionslaboratorium) unter Leitung von Herrn Privatdozent Dr.P.Shah ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher in keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät bzw. Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht,noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Flörsheim,den 22.6.1983

Maja Ottnad-Walz

L E B E N S L A U F

Am 16. Juli 1953 wurde ich, Maja-Alexandra, Cornelia Ottnad-Walz, als Tochter des Angestellten Alexander Ottnad und seiner Ehefrau Henny geb. Moeck in München geboren.

Von 1959-1960 besuchte ich die Volksschule/Steinebach,
von 1960-1961 " " " /Ravensburg,
von 1961-1963 " " " /Lindau-Hoyren,
von 1963-1966 " " das Sophie-Scholl-Gymnasium in München,
von 1966-1969 " " das Max-Joseph-Stift München,
von 1969-1972 " " das Gymnasium Starnberg.

Dort bestand ich das Abitur 1972. Von 1972-1976 erhielt ich eine Ausbildung als Zahntechniker, die ich mit der Gesellenprüfung abschloß. Das folgende Jahr war ich als Zahntechniker angestellt. Im Wintersemester 1977/78 begann ich mein Studium der Zahnmedizin an der Universität Marburg. Ab Wintersemester 1978/79 studierte ich bis zum Staatsexamen, das ich Dezember 1982 bestand, in Frankfurt am Main. Im Juli 1981 heiratete ich den Zahnarzt Rainer Walz.

Maja Ottnad-Walz

D A N K S A G U N G

Herrn Privatdozent Dr.P.Shah danke ich für die Überlassung des Themas und für die freundliche Unterstützung während der Abfassung dieser Arbeit.